

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年10 月13 日 (13.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/095958 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/50, 33/15, 33/68
 (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006728
 (22) 国際出願日: 2005 年3 月30 日 (30.03.2005)
 (25) 国際出願の言語: 日本語
 (26) 国際公開の言語: 日本語
 (30) 優先権データ:
 特願2004-107746 2004 年3 月31 日 (31.03.2004) JP
 (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アン
 ジェスMG 株式会社 (ANGESMG, INC.) [JP/JP]; 〒
 5670085 大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7 番1 5 号
 Osaka (JP).
 (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 里 直行 (SATO,

Naoyuki) [JP/JP]; 〒6550025 兵庫県神戸市垂水区
 瑞ヶ丘5-19 Hyogo (JP). 大河内 正康 (OKOUCHI,
 Masayasu) [JP/JP]; 〒6128423 京都府京都市伏見区竹
 田内畑町229 Kyoto (JP). 谷山 義明 (TANIYAMA,
 Yoshiaki) [JP/JP]; 〒5650821 大阪府吹田市山田東4-
 1-1-406 Osaka (JP). 荻原 俊男 (OGIWARA,
 Toshio) [JP/JP]; 〒5620001 大阪府箕面市箕面8-4-
 16 Osaka (JP). 森下 竜一 (MORISHITA, Ryuichi)
 [JP/JP]; 〒5650851 大阪府吹田市千里山西1-41-
 4 Osaka (JP).

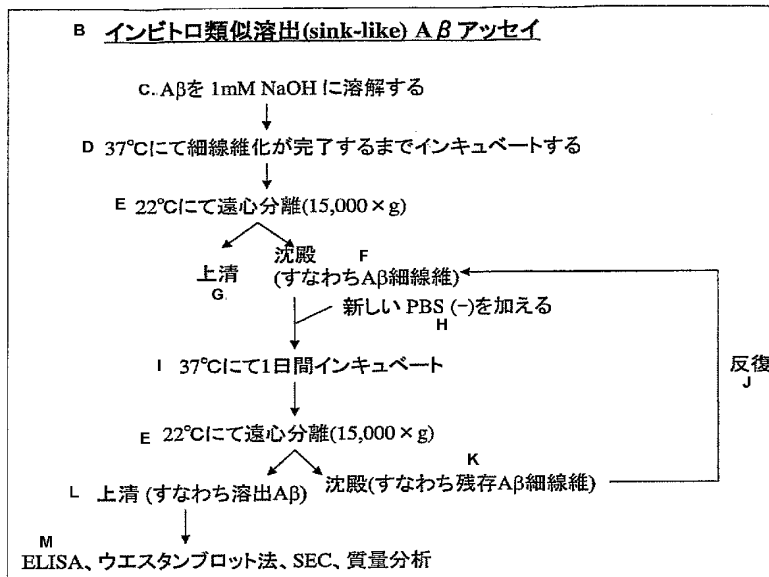
(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044
 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1 番1 号 明治安
 田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
 可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
 BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,

[続葉有]

(54) Title: ASSAY METHOD OF IDENTIFYING CANDIDATE FOR DRUG

(54) 発明の名称: 薬剤候補を同定するためのアッセイ法

B.. IN VITRO (sink-like) ELUTION Aβ ASSAY

C.. DISSOLVING AB IN 1 MM NaOH

D.. INCUBATING AT 37 °C UNTIL THE COMPLETION OF FIBRIL FORMATION

E.. CENTRIFUGING AT 22 °C (15,000×g)

F.. PRECIPITATE (Aβ FIBRIL)

G.. SUPERNATANT

H.. ADDING FRESH PBS(-)

I.. INCUBATING AT 37 °C FOR 1 DAY

J.. REPEATING

K.. PRECIPITATE (REMAINING AB FIBRIL)

L.. SUPERNATANT (ELUTED Aβ)

M.. ELISA, WETERN BLOTTING, SEC, MASS SPECTROSCOPY

(57) Abstract: It is intended to provide a method of identifying a candidate for a drug which comprises measuring the concentration of a soluble peptide, oligopeptide, polypeptide or protein in an equilibrated state in a solvent in the presence of a test compound so that the peptide, oligopeptide, polypeptide or protein can be eliminated from a fibril or an aggregate. It is also intended to provide an elution promoter for eliminating a peptide, an oligopeptide, a polypeptide or a protein from a fibril or an aggregate which comprises a compound obtained by the above identification method as the active ingredient.

(57) 要約: 本発明は、被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維(fibril)または凝集物(aggregate)からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法を提供する。さらに本発明は、当該同定方法により得られる化合物を有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出促進剤を提供する。

WO 2005/095958 A1



DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

薬剤候補を同定するためのアッセイ法

技術分野

本発明は、細繊維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド
5 またはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法に関する。

背景技術

アミロイド β （以下、 $A\beta$ ともいう）を含む老人斑は、アルツハイマー病の病理像の一つである。

$A\beta$ の低下は主要な治療対象だと思われる。

10 抗 $A\beta$ 抗体による免疫化後のアミロイド除去が報告されている。

最近のデータは、抗体が $A\beta$ の末梢溶出（sink）として働き、末梢／脳の動力学を変化させているかもしれないことを示している。

老人斑が消失したという事実は、 $A\beta$ 凝集過程が可逆的であることを意味している。

15 しかしながら今なお、可溶性 $A\beta$ が凝集 $A\beta$ から溶出した証拠は存在しない。

ここで本発明者らは、インビトロで細繊維の遠心分離に続く上清への移行（replicate）を分析する類似溶出（sink-like） $A\beta$ アッセイを開発したものであり、可溶性 $A\beta$ が凝集 $A\beta$ から溶出したことのみならず、超音波が $A\beta$ 溶出を促進したことを示すものである。

20 このインビトロ類似溶出（sink-like） $A\beta$ アッセイにおいて $A\beta$ 溶出を促進する化合物あるいは超音波は、アルツハイマー病治療の可能性ある選択肢になり得るかもしれない。

アルツハイマー病（AD）は、脳における老人斑の存在によって特徴付けられる、神経変性疾患である。

25 40～42アミノ酸からなるペプチドの $A\beta$ は、老人斑の主成分である。

この疾患の遺伝性型は、アミロイド前駆タンパク（APP）およびプレセニリン（presenilin）遺伝子の変異に関連している。

これらの遺伝子における疾患に関連する変異は、老人斑において優勢に存在するA β (1-42) 産生の増加をもたらす。

最近、変異APP遺伝子導入マウスへのA β による免疫付与が、プラーク沈着の抑制に効果的であることが示された。(Schenk, Barbour et al. 1999年)

さらに、A β 抗体の単回投与後、プラークおよび神経病変の双方が可逆的であった。(Lombardo, Stern et al. 2003年)

A β 抗体に加え、A β (gelsoolinまたはGM1) に高い親和性を有する薬剤による末梢治療は、脳内におけるA β レベルを低下させた。(Matsuo ka, Saito et al. 2003年)

抗体投与による末梢での溶出 (sink) メカニズムの発現は、細胞外スペースへの異常タンパク蓄積により特徴付けられる多数の疾患の治療に有用であることが提案されている。(DeMattos, Bales et al. 2001年)

15 インビトロでの、A β 凝集過程については十分に研究されている。

しかしながら、凝集A β からA β が溶出する反対の現象は、まだ研究されていなかった。

本研究においては、凝集A β からのA β 溶出について検討するため、我々は新規なインビトロ類似溶出 (sink-like) A β アッセイを開発した。

20 ここで、我々は可溶性A β が凝集A β から溶出したことを示すものである。

さらに、超音波はA β 溶出を促進した。

このインビトロ類似溶出 (sink-like) A β アッセイにおいてA β 溶出を促進した化合物および／または超音波は、アルツハイマー病治療の選択肢となり得るかもしれない。

25 WO 94/10569公報 (特表平8-502587号) には、患者において β -アミロイド・ペプチド (以下、 β APともいう) -関連症状を診断又はモニタリングする方法であって：患者サンプル中の可溶性 β AP又は β AP断片の量

を測定し；その測定値を所定量の β A P又は β A P断片と比較し；そして測定された β A P又は β A P断片の量と所定の β A P又は β A P断片の量との間の差異に基づき患者の状態を評価することを含んで成る方法が開示されている。(請求項23)

5 WO 00/26238 公報 (特表2002-531065号) には、プリオンタンパク質のサンプルを提供し、試験試薬の存在下および不存在下で質的若しくは量的に β 形態の量を比較することを含む、 β 形態へのプリオンタンパク質の変換を予防、減少及び／または可逆化可能である試薬の同定方法が開示されている。(請求項50)

10 WO 00/43791 (特表2002-540383号) 公報には、神経変性疾病凝集体形成または原繊維形成種を結合可能な種および神経変性疾病凝集体または原繊維形成を阻害する候補薬剤のための神経変性疾病凝集体または原繊維形成種を含むと考えられる1個のサンプルを含む溶液を作成することと、成分を前記溶液に移したり、容器から溶液を取り出したりせずに、神経変性疾病に特徴的な溶液中の凝集体を検出することより成る方法を開示している。(請求項172)

しかしながらこれらの先行技術は、多数のテスト化合物を評価するには、容易でない、迅速でない、信頼性が高くない、あるいは安価でない方法であった。

発明の開示

20 本発明者らは、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療に用いることができる薬剤候補を同定する方法を確立すべく、鋭意検討を重ねた。そして、A β 凝集過程が可逆的であることを知見し、被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維(fibril)または凝集物(aggregate)からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパ

25 克を除去することのできる薬剤候補を同定できる方法を確立した。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維(fibril)または凝集物(aggregate)からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法。

5 (2) 薬剤候補が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療に用いられるものである、上記(1)記載の方法。

(3) 疾患がアルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、ハンチントン舞踏病、プリオン病、ダウン症、レビー小体型痴呆症、多系統萎縮症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー症候群、狂牛病、球脊髄性

10 筋萎縮症、脊髄小脳失調症(SCA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRPLA)、家族性筋萎縮性側索硬化症、FTDP-17 (frontotemporal dementia and parkinsonisms linked to chromosome 17、第17番染色体に連鎖するパーキンソン症候群を伴った前頭側頭型痴呆)、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、ピック病、familial British dementia およびニューロセリン封入体を伴う家族性痴呆症からなる群より選ばれた疾患である、上記(1)または(2)記載の方法。

(4) 細線維または凝集物がインビトロで形成されたものである、上記(1)ないし(3)いずれか記載の方法。

(5) 平衡状態が超音波照射下にもたらされたものである、上記(1)ないし(4) 20 いずれか記載の方法。

(6) 超音波照射が実質的に熱発生を伴わないものである、上記(1)ないし(5) いずれか記載の方法。

(7) 超音波照射条件が、1 MHz、2 W/cm²、デューティ比20%、30秒照射に続き10秒休止の5回反復である、上記(1)ないし(6) いずれか記 25 載の方法。

(8) 被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性β-アミロイド(Aβ)の溶媒中濃度を測定することにより、インビトロで凝集した細線維または凝集物から

β -アミロイド ($A\beta$) を除去することのできる薬剤候補を同定する方法。

(9) 細線維または凝集物が $A\beta$ (1-40) からなる、上記 (8) 記載の方法。

(10) 細線維または凝集物が $A\beta$ (1-42) からなる、上記 (8) 記載の方法。

5 (11) 平衡状態が超音波照射下にもたらされたものである、上記 (8) ないし (10) いずれか記載の方法。

(12) 超音波照射が実質的に熱発生を伴わないものである、上記 (8) ないし (11) いずれか記載の方法。

(13) 超音波照射条件が、1 MHz、2 W/cm²、デューティ比 20%、30 秒照射に続き 10 秒休止の 5 回反復である、上記 (8) ないし (12) いずれか記載の方法。

(14) 患者に超音波照射することからなる、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療方法。

(15) 疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病、プリオン病、ダウン症、レビー小体型痴呆症、多系統萎縮症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー症候群、狂牛病、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症 (SCA)、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、家族性筋萎縮性側索硬化症、FTDP-17、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、ピック病、familial British dementia およびニューロセルピン封入体を伴う家族性痴呆症からなる群より選ばれた疾患である、上記 (14) 記載の方法。

(16) 上記 (1) ないし (13) いずれか記載の方法により得られる化合物を有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出促進剤。

(17) デヒドロポルフィリン第 2 鉄 IX、アムホテリシン B、ミリセチン、タニン酸、クルクミン、アズール B およびベーシックブルー 41 からなる群より選ばれる少なくとも 1 つを有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出促

進剤。

(18) 上記(1)ないし(13)いずれか記載の方法により得られる化合物を用いて、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを溶出する溶出方法。

- 5 (19) 細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための、上記(1)ないし(13)いずれか記載の方法により得られる化合物の使用。

(20) ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患を治療するための装置であって、超音波を患部に照射し、細線維または

- 10 凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去する手段を有することを特徴とする装置。

(21) 被験化合物の存在下、細線維または凝集物から溶出した可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタ

- 15 ンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法。

図面の簡単な説明

図1. インビトロ類似溶出(sink-like) $A\beta$ アッセイの実験手順を示した図である。

図2. 溶出 $A\beta$ (1-40) および $A\beta$ (1-42) のためのサンドイッチ EL

- 20 I S A 法の結果、可溶性 $A\beta$ が凝集 $A\beta$ から溶出したことを示した図である。

図3. 溶出 $A\beta$ (1-40) および $A\beta$ (1-42) のための質量分析の結果を示した図である。

図4. 溶出 $A\beta$ (1-40) のウエスタンブロット法分析の結果を示した図である。

- 25 図5. 超音波が $A\beta$ 溶出を促進したことを表す、溶出 $A\beta$ (1-40) の SEC 分析を示した図である。

図6. 超音波の実験手順を示した図である。

図 7. 溶出 A β (1-40) のサンドイッチ E L I S A 法の結果を示した図である。

図 8. A β (1-42) の細線維化およびオリゴマー化の、S E C 分析を示した図である。

5 図 9. インビトロ類似溶出 (s i n k - l i k e) A β アッセイを図式的に示した図である。

図 10. 実施例 2 の結果を示した図である。

発明の詳細な説明

10 以下、本発明を詳細に説明する。

<薬剤候補の同定方法>

本発明は、被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維または凝集物から、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを

15 除去することのできる薬剤候補を同定する方法を提供する。

本発明の同定方法の工程においては、被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度が測定される。

被験化合物は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、

20 核酸、糖質、脂質、タンパク質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、または微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。あるいは、被験化合物は、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する

25 疾患の治療に実際に用いられているものであってもよい。

上記、可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクとしては、それらの凝集によって弊害、延いては疾患が引き起こされ得るものであれば

特に限定されないが、例えば、 $A\beta$ 、プリオンタンパク質、ポリグルタミン、 α シヌクレイン、タウ、スーパーオキシドジムターゼ1 (SOD1)、ニューロセルピン、アミロイド前駆タンパク質 (APP) などが挙げられる。

$A\beta$ は、アルツハイマー病の主要な神経病理学的変化の1つである老人斑を構成する主要成分であり、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) が2種の (β 及び γ) セクレターゼで切断されることにより産生される。その主要な分子種として、40アミノ酸残基からなる $A\beta$ (1-40) (配列番号: 1) とC末端側がさらに2残基長い $A\beta$ (1-42) (配列番号: 2) がある。

$A\beta$ の凝集あるいは蓄積は、アルツハイマー病、ダウン症などの疾患の原因とされており、その蓄積部位は老人斑および脳血管アミロイドである。プリオンタンパク質の凝集あるいは蓄積は、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー症候群、狂牛病などの疾患の原因とされており、その蓄積部位はシナプス、神経細胞およびクル班アミロイドである。ポリグルタミンの凝集あるいは蓄積は、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症 (SCA)、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症 (DRPLA)、ハンチントン舞踏病などの疾患の原因とされており、その蓄積部位は神経細胞核内封入体である。 α シヌクレインの凝集あるいは蓄積は、パーキンソン病、レビー小体型痴呆症、多系統萎縮症などの疾患の原因とされており、その蓄積部位はレビー小体 (神経細胞内) およびオリゴデンドロサイト (GCI) である。タウの凝集あるいは蓄積は、アルツハイマー病、FTDP-17、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、ピック病などの疾患の原因とされており、その蓄積部位は神経原繊維変化部位、グリア細胞内封入体およびピック球である。スーパーオキシドジムターゼ1の凝集あるいは蓄積は、家族性筋萎縮性側索硬化症などの疾患の原因とされており、その蓄積部位はレビー小体様封入体である。ニューロセルピンの凝集および蓄積は、ニューロセルピン封入体を伴う家族性痴呆症などの疾患の原因とされており、その蓄積部位はCollins小体 (神経細胞内) である。ABripetチドの凝集あるいは蓄積は、familial British dementia などの疾患の原因とされており、その蓄積部位は脳・血管アミロ

イドである。

本発明において「平衡状態にある」とは、不溶性であるペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの細線維や凝集物から、可溶性のペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクが溶媒中へ溶出する速度と、溶媒
5 中の可溶性のペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクが凝集して、不溶性の細線維や凝集物を形成する速度とが同一で、釣り合っている状態をいう。

本発明の同定方法の工程は、被験化合物の存在下、単に細線維または凝集物から溶出した可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶
10 媒中濃度を測定することによって行ってもよい。

本発明において、細線維とはペプチド等が線状に連なった直径 $1 \mu\text{m}$ 前後の構造体のことであり、凝集物とは複数の細線維の集合体のことである。細線維または凝集物は、インビトロで形成されたものであっても、インビボで形成されたものであってもよいが、薬剤候補同定の効率、操作性、試験の再現性などを考察す
15 ると、インビトロで形成されたものが好ましい。

また、本発明において「除去する」とは、凝集したペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの細線維または凝集物から、可溶性のペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを溶出させて取り除くことをいう。

平衡状態のサンプルを調製するには、例えば、溶媒に可溶性ペプチド、オリゴ
20 ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク、あるいはそれらの細線維または凝集物を加え、適切な温度（通常 $0 \sim 40^\circ\text{C}$ ）にて平衡状態が達成されるまで放置すればよい。平衡状態に達したことは、溶媒中の可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの濃度を経時的に測定することで確認できる。平衡状態が達成された段階で、反応系に被験化合物を加え、適温（通常 37°C 前後）
25 でインキュベート（好ましくは1日間）する。適切な温度（通常 $0 \sim 40^\circ\text{C}$ ）で $1 \sim 60$ 分間遠心分離した後、得られた上清を分析に供す。

また、平衡状態ではないサンプルを調製するには、例えば、ペプチド、オリゴ

ペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを溶媒に加え、適当な温度（通常 0～40℃）で 1～6 時間インキュベートすることによって細線維化または凝集させる。細線維化または凝集が完了した段階で、適切な温度（通常 0～40℃）で 1～60 分間遠心分離するなどして上清を取り除く。その後、得られた上清に被験化合物
5 物を加え、適温（通常 37℃前後）でインキュベート（好ましくは 1 日間）する。適切な温度（通常 0～40℃）で 1～60 分間遠心分離した後、上清を採取し分析に供す。

ここで、本発明の方法で用いられる溶媒としては、本発明の目的を妨げないものであれば特に限定されないが、例えば、PBS、酢酸緩衝液、クエン酸緩衝液、
10 トリス塩酸緩衝液などの緩衝液が用いられる。かかる溶媒は、生理的条件の観点から、pH 3～8 程度、より好ましくは pH 6～8 程度に調整するのが好ましい。

可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度は、自体公知の方法を使用して測定できる。例えば、ELISA、ウエスタンブロット法、質量分析、サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）等の方法により測
15 定できる。

上記測定の結果、被験化合物を添加しない場合と比較して、被験化合物を添加したときに可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度の上昇が確認できれば、その被験化合物は細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬
20 剤候補と判定され得る。このようにして得られた化合物は様々な用途に用いられ得、例えば、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の予防・治療薬あるいは該疾患の研究用試薬の開発に有用である。かかる疾患としては、例えば、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、ハンチントン舞踏病、プリオン病、ダウン症、レビー小体型痴呆症、多系統萎縮
25 症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー症候群、狂牛病、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症（SCA）、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）、家族性筋萎縮性側索硬化症、FTDP-17、進行性核上性麻

痺、皮質基底核変性症、ピック病、familial British dementia またはニューロセルピン封入体を伴う家族性痴呆症などが挙げられる。本発明によれば、本発明の同定方法により得られる化合物もまた提供される。

本発明の同定方法においては、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの種類を適宜選択することによって、特定のペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの細線維または凝集物から、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを特異的に除去することのできる薬剤候補を得ることができる。このような薬剤候補は、当該特定のペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の予防・治療に有用であり得る。

<超音波>

上記平衡状態は、超音波照射下でもたらされたものであってもよい。かかる超音波照射は実質的に熱発生を伴わないものが好ましい。また、超音波照射は特に限定はされないが、通常、 $1 \sim 20 \text{ MHz}$ 、 $0.1 \sim 10 \text{ W/cm}^2$ 、デューティー比 $10 \sim 90\%$ の条件で、 10 秒照射に続き 10 秒休止を 15 回繰り返して行い、より好ましくは、 $2.5 \sim 7.5 \text{ MHz}$ 、 $0.5 \sim 5 \text{ W/cm}^2$ 、デューティー比 $20 \sim 70\%$ の条件で、 30 秒照射に続き 10 秒休止を 5 回繰り返して行う。ここでデューティー比とは、送信時間 / (送信時間 + 送信間隔) のことである。

上記超音波照射は、細線維または凝集物からのペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパク除去を促進する。したがって、超音波照射は平衡状態への到達時間を速め、より迅速な薬剤候補の同定を可能とする。

また、超音波照射することによって、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去する方法も本発明の範疇とする。

さらに、本発明には、患者に超音波照射することからなる、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療方法も含まれるものとする。

本発明はまた、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝

集に起因する疾患を治療するための装置であつて、超音波を患部に照射し、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去する手段を有することを特徴とする装置を提供する。

- ここで、超音波照射は、通常、 $1 \sim 20 \text{ MHz}$ 、 $0.1 \sim 10 \text{ W/cm}^2$ 、デューティー比 $10 \sim 90\%$ の条件で、 10 秒照射に続き 10 秒休止を 15 回繰り返して行い、より好ましくは、 $2.5 \sim 7.5 \text{ MHz}$ 、 $0.5 \sim 5 \text{ W/cm}^2$ 、デューティー比 $20 \sim 70\%$ の条件で、 30 秒照射に続き 10 秒休止を 5 回繰り返して行う。

<溶出促進剤>

- 10 本発明は、上記の同定方法により得られる化合物を有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出促進剤を提供する。

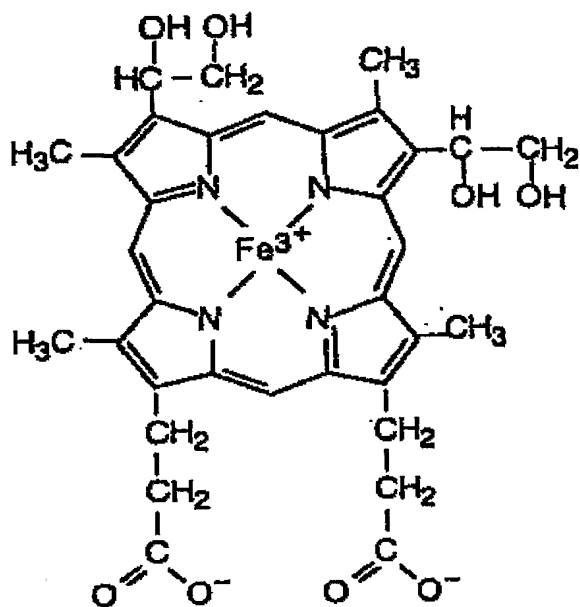
下記の実施例から明らかなように、上記同定方法により得られた化合物として、デヒドロポルフィリン第2鉄IX、アムホテリシンB、ミリセチン、タンニン酸、

- 15 クルクミン、アズールBおよびベーシックブルー41が提供される。

従って、本発明は、デヒドロポルフィリン第2鉄IX、アムホテリシンB、ミリセチン、タンニン酸、クルクミン、アズールBおよびベーシックブルー41から選ばれる少なくとも1つを有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出

- 20 促進剤を提供する。

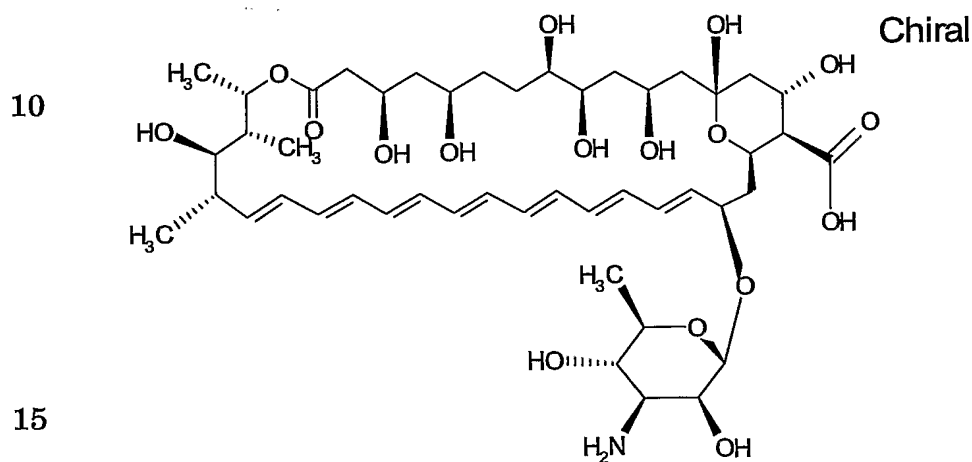
デヒドロポルフィリン第2鉄IXは、以下の化学式1：



(化学式 1)

で表される化合物であり、プロテアーゼに対して抵抗性を有するタンパク質 (Pr P-res; protease-resistant protein) の形成をインビトロで阻害し伝達性海綿状脳症の治療に有用である可能性がある」と報告されている (S.A. Priola et al., 5 Science, 287, 1503 (Feb 25, 2000))。また、タウフィラメント形成を阻害するとの報告もある (S. Taniguchi et al., J Biol Chem, 280(9), 7614-7623, 2005)。

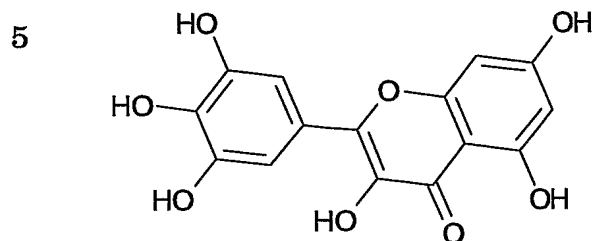
アムホテリシン B は以下の化学式 2 :



(化学式 2)

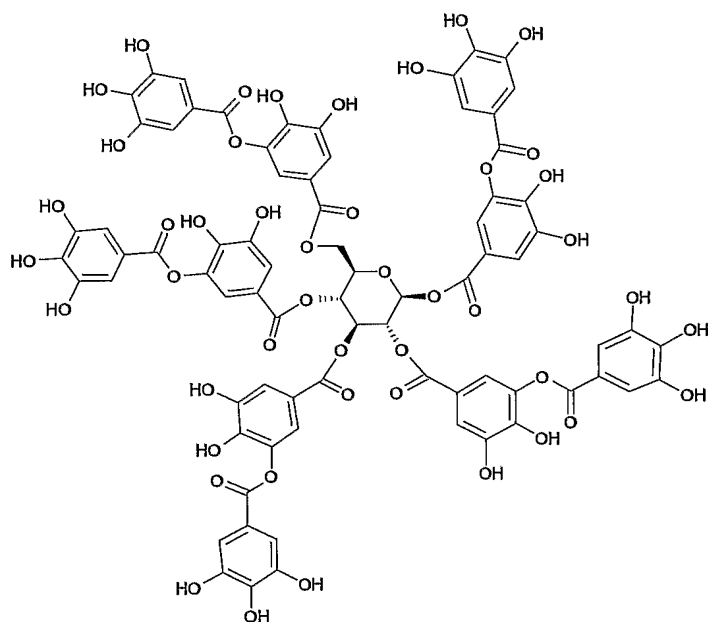
で表される化合物であり、 $A\beta$ 繊維の形成を遅らす働きがあることが知られている (S.C. Hartsel et al., Biochemistry 42, 6228 (May 27, 2003))。

ミリセチンおよびタンニン酸はそれぞれ以下の化学式 3 および 4 :



(化学式 3)

10



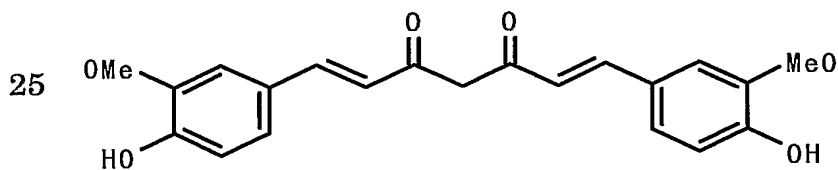
15

20

(化学式 4)

で表される化合物であり、インビトロで $A\beta$ の形成・伸張に阻害作用を示すことが報告されている (K. Ono, Biochim Biophys Acta 1690, 193 (Nov 5, 2004))。

クルクミンは以下の化学式 5 :

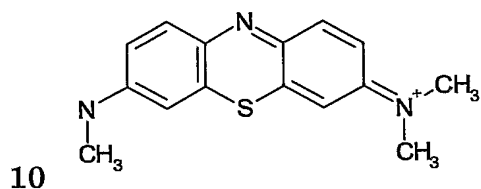


(化学式 5)

で表される化合物であり、 $A\beta$ (1-40) 繊維の形成を阻害することが報告されており (F. Yang et al., J Biol Chem, 280(7), 5892-5901, 2005)、アルツハイマー治療薬として効果があることが知られている (G. P. Lim et al., J Neurosci, 21(21):8370-7 (Nov 1, 2001)およびWO03/103583)。

5 アズールBは以下の化学式6：

Cl^-

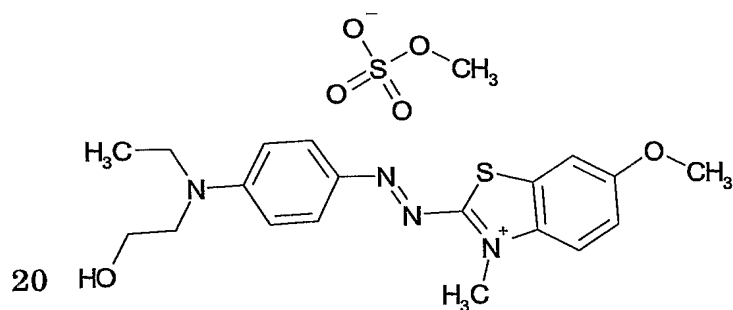


(化学式6)

で表される化合物であり、タウフィラメント形成を阻害することが報告されている (S. Taniguchi et al., J Biol Chem 280(9), 7614-7623, 2005)。

ベーシックブルー41は以下の化学式7：

15



(化学式7)

で表される化合物であり、チオフラビンTの1種で、チオフラビンTはアミロイド繊維の蛍光インディケーターであることが知られている (H. Nakai et al, Lab Invest 62, 768 (Jun 1990))。

本発明の溶出促進剤は、細繊維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去する作用を高めることができるため、ペプチ

ド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の予防または治療に有用である。

また、上記化合物は各々上述した文献に記載されているように、種々の疾患に用いられることが公知であるが、本発明において細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを溶出しうることが新たに知見されたため、これらの化合物を含有する溶出促進剤もペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の予防または治療に用いられ得ることが示唆された。

本発明の溶出促進剤は、上記の化合物に加え、任意の担体などを含有できる。

10 任意の担体としては、医薬上許容され得る担体（後述）が挙げられる。

本発明の溶出促進剤は、医薬又は試験用試薬などとして、あるいはインビボ又はインビトロにおいて用いられ得る。本発明の溶出促進剤が医薬として使用される場合、動物（例えば、ヒト、サル、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、ウサギ、ラット、マウス等の哺乳動物）に経口または非経口で投与することができ、錠剤、カプセル剤、トローチ、顆粒剤、散剤等の経口投与剤の剤形で、または、外用剤（液剤、ローション剤、懸濁剤、乳剤、クリーム、軟膏、ゲル剤等）、注射剤、坐剤等の剤形で用いられ得る。

医薬上許容され得る担体としては、例えば、ショ糖、デンプン、マンニット、ソルビット、乳糖、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウム、炭酸カルシウム等の賦形剤、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリプロピルピロリドン、ゼラチン、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、ショ糖、デンプン等の結合剤、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルスターチ、ナトリウム－グリコールスターチ、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウム、クエン酸カルシウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、エアロジル、タルク、ラウリル硫酸ナトリウム等の滑剤、クエン酸、メントール、グリシルリシン・アンモニウム塩、グリシン、オレンジ粉等の芳香剤、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベン、プロ

ピルパラベン等の保存剤、クエン酸、クエン酸ナトリウム、酢酸等の安定剤、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ステアリン酸アルミニウム等の懸濁剤、界面活性剤等の分散剤、水、生理食塩水、オレンジジュース等の希釈剤、カカオ脂、ポリエチレングリコール、白灯油等のベースワックスなどが挙げられるが、

5 それらに限定されるものではない。

経口投与に好適な製剤は、水、生理食塩水、オレンジジュースのような希釈液に有効量の物質を溶解させた液剤、有効量の物質を固体や顆粒として含んでいるカプセル剤、サッシェ剤または錠剤、適当な分散媒中に有効量の物質を懸濁させた懸濁液剤、有効量の物質を溶解させた溶液を適当な分散媒中に分散させ乳化さ

10 せた乳剤等である。

非経口的な投与（例えば、皮下注射、筋肉注射、局所注入、腹腔内投与など）に好適な製剤としては、水性および非水性の等張な無菌の注射液剤があり、これには抗酸化剤、緩衝液、制菌剤、等張化剤等が含まれていてもよい。また、水性および非水性の無菌の懸濁液剤が挙げられ、これには懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、

15 安定化剤、防腐剤等が含まれていてもよい。当該製剤は、アンプルやバイアルのように単位投与量あるいは複数回投与量ずつ容器に封入することができる。また、有効成分および医薬上許容され得る担体を凍結乾燥し、使用直前に適当な無菌のビヒクルに溶解または懸濁すればよい状態で保存することもできる。

20 本発明の溶出促進剤の投与量は、有効成分の活性や種類、病気の重篤度、投与対象となる動物種、投与対象の薬物受容性、体重、年齢等によって異なり一概に云えないが、通常、成人1日あたり有効成分量として約0.001～約5mg/kgである。

実施例

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に

25 制限されるものではない。

実施例 1

(I) 方法

(1) 薬品および溶媒

特に明示がない限り、薬品はシグマあるいは和光から入手した。

水は2回蒸留し、Milli-Q システム (ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ州) を用いて脱イオン化した。

5 (2) ペプチド

A β (1-40) および A β (1-42) はペプチド研究所 (大阪、日本) から入手した。A β 溶液は実験毎に、記載のようにして新しく調製した (Hartley, Walsh et al. 1999)。A β (1-40) ペプチド 0.55mg を、0.01% フェノールレッドを含む 1 mM NaOH 130 μ l に溶解した。

- 10 pH 7.5 に調整するため、10mM NaOH を加えた。500 μ M A β 溶液を得るため、PBS/ddH₂O を加えた。溶解しなかった A β を取り除くため、上清を分取する前に遠心分離した。(15,000 \times g, 3 分間)

(3) サンプル調製

- 500 μ M A β 溶液 20 μ l を、1.5ml エッペンドルフ管に分取した。サンプルは細
15 線維化が完了するまで、37 $^{\circ}$ C にて何通りかの時間インキュベートした。22 $^{\circ}$ C で遠心分離した後 (15,000 \times g, 10 分間)、上清を除いた。

- 得られたペレット (すなわち A β 細線維) をリン酸緩衝液 (PBS) で 3 回洗浄した。そのペレットに、新しい PBS 20 μ l を徐々に注意深く加えた。このサンプルを、37 $^{\circ}$ C にて 1 日間インキュベートした。22 $^{\circ}$ C において遠心分離した後 (15,000 \times g, 1
20 0 分間)、上清 16 μ l を採取し分析に供した。残りの上清は取り除いた。そのペレットに、新しい PBS 20 μ l を徐々に注意深く加えた。

これらの操作を繰り返した。(図 1 参照)

サンプルを、下記のようにして、ELISA、ウエスタンブロット法、質量分析、サイズ排除クロマトグラフィ (SEC) により分析した。

25 (4) サンドイッチ法 A β ELISA

A β (1-40) および A β (1-42) のためのサンドイッチ ELISA 法は、それぞれ A β (1-40) ELISA キットおよび A β (1-42) ELISA キット (Biosource 社、I B L 社、Sign

et Laboratories 社など)を用いて行った。

(5) SEC

注入器および紫外検出器からなる HPLC システムに、Superose 6 カラム (Amersham) を取り付けた。カラムから 0.04ml/分にて溶出させ、ペプチドは 218nm の紫外

5 吸収にて検出した。

各実験は少なくとも 2 回行った。実験の間にプレパックカラムを 2N NaOH で洗浄した。

それぞれの検討のため、適切なカラムを少なくともカラム体積の 3 倍量の溶出緩衝液で平衡化し、次いで 5 種類の分子量標準品: トリ・オブアルブミン (44, 00
10 0); ウマ・ミオグロビン (17, 000); ヒト γ -グロブリン (158, 000); ウシ・サイロ
グロブリン (670, 000); およびビタミン B₁₂ (1, 350) を用いて校正した。

溶出緩衝液として、75mM NaCl、5mM Tris-HCl (pH 7.4) を用いた。

(6) ゲル電気泳動およびウェスタンブロット法

Tris/Tricine ゲル (Invitrogen) を用い、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S
15 DS-PAGE) を行った。サンプルを、2×SDS サンプル緩衝液 (Invitrogen) と混合し、
電気泳動に先立ち 5 分間急速沸騰させた。サンプルをポリビニリデン・ジフルオ
リド (PVDF) 膜 (ミリポア、ベッドフォード、マサチューセッツ、米国) 上に移した。

ウェスタンブロット法は、6E10 抗体を用いて行った。

ECL を検出システムとして用いた。

20 (7) 質量分析

A β 種の、免疫沈降/マトリックス支援レーザーイオン化-飛行時間型 (MALDI-TO
F)、複合質量分析計 (IP/MS) 分析を記載のように行なった。(Okochi, Steiner
et al. 2002)

(8) 超音波

25 サンプル管に、室温にて 30 秒間超音波処理 (2.5W/cm²) した。(30 秒照射の 5 回
繰り返し)

(I I) 結果

可溶性 A β が凝集 A β から溶出した。

(1) 溶出 A β (1-40) および A β (1-42) のための、サンドイッチ ELISA 法

溶出 A β (1-40) および A β (1-42) のための、サンドイッチ ELISA 法を記載の実験法により行った。溶出した A β (1-40) 量は、 6562.5 ± 1750.9 (S.E.) pg/ml であつた (n=6)。溶出した A β (1-42) 量は、 1939.7 ± 607.6 (S.E.) pg/ml であつた (n=6)。それぞれの結果を図 2 に示す。

(2) 溶出 A β (1-40) および A β (1-42) 質量分析

質量分析にて、溶出した A β (1-40) および A β (1-40) の分子量、それぞれ 4329.8 と 4514.0 を確認した。(図 3)

10 (3) 溶出 A β (1-40) のウェスタンブロット

低分子量のほぼ単一のバンドの検出を示した。(図 4)

(4) 溶出 A β (1-40) および A β (1-42) の SEC 分析

SEC 分析は、十分な単一の 2.4ml ピークを示した。(図 5)

(5) 超音波の効果

15 超音波は A β 溶出を促進した。

サンプル管に、室温にて 30 秒間、デューティー比 20% で超音波処理 ($2.5\text{W}/\text{cm}^2$) した。(30 秒照射の 5 回繰り返し)

溶出 A β (1-40) および A β (1-42) のための、サンドイッチ ELISA 法を行った。

30 秒間の超音波 ($2.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、デューティー比 20%、室温、30 秒照射の 5 回繰り返し)

20 返し) は、A β (1-40) 溶出を促進した。(図 6)

(コントロール群: 8791.7 ± 3121.1 (S.E.) pg/ml (n=3); 超音波群: 49479.3 ± 2167.6 (S.E.) pg/ml (n=3); p 0.001 未満)

もう一つの、デューティー比 50% での実験方法 (30 秒、 $2.5\text{W}/\text{cm}^2$ 、室温、30 秒照射の 2 回繰り返し) もまた、A β (1-40) 溶出を促進した。

25 (コントロール群: 8791.7 ± 3121.1 (S.E.) pg/ml (n=3); 超音波群 50% \times 2 回: 5520 ± 7140 (S.E.) pg/ml (n=3); p 0.05 未満)

超音波の効果を図 7 に示す。

(6) A β (1-42)細線維化およびオリゴマー化の、SEC 分析

溶解後直ちに記述の実験方法にて、可溶性 A β (1-42)を Superose 6 クロマトグラフィー分析した。結果を図 8 に示す。

ゲルに由来するピーク (gel-included peak) は 1.9ml において溶出した。

- 5 このピーク中の A β オリゴマー・サイズを決定することはできなかった。

大きなオリゴマーと細線維前駆体は、1 時間から 12 時間の間に観察された (図中、矢印または三角印)。

2.4m のピークは 5h 時に上昇した (図中、矢印)。

このピークは、SEC において A β (1-40)溶出が分析された時観察されたので、同

- 10 ジフラクションに溶出した。

実施例 2

(I) 方法

(1) 薬品および溶媒

- 15 デヒドロポリフィリン第 2 鉄 I X、アムホテリシン B、ミリセチン、タンニン酸、クルクミン、アズール B およびベーシックブルー 4 1 はそれぞれ、Sigma-Aldrich 社から入手した。

上記以外は実施例 1 と同様にして準備した。

(2) ペプチド

- 20 ペプチドは実施例 1 の (I) - (2) と同様にして準備した。

(3) サンプル調製

500 μ M A β (1-42) 溶液 20 μ l を 1.5ml 管に分取した。37°C にて細線維化が完了するまで、ペプチドを数日間インキュベートした。22°C にて遠心分離後 (15,000 \times g, 10 分間)、上清を取り除いた。得られたペレットを PBS で 3 回徐々に慎重に洗浄
25 した。ペレットに、新しい PBS 20 μ l を徐々に注意深く加えた。サンプルを 37°C にて 1 日間インキュベートした。22°C にて遠心分離後 (15,000 \times g, 10 分間)、上清を取り除いた。次いで、化合物：デヒドロポリフィリン第 2 鉄 I X、アムホテ

リシンB、ミリセチン、タンニン酸、クルクミン、アズールBまたはベーシックブルー41をそれぞれ含んだ新しいPBS 20 μ lおよびコントロールとして化合物含まない新しいPBS 20 μ lをペレットにゆっくりと注意深く加えた。サンプルを37°Cにて1日間インキュベートした。22°Cにて遠心分離後(15,000 \times g, 10分間)、

- 5 上清16 μ l(細線維から溶出したA β)を採取しA β ELISA分析により分析した。

(I I) 結果

結果を表1および図10に示す。

表1.

	平均	SE
デヒドロポリフィリン第2鉄IX	1.4124	0.224152
アムホテリシンB	1.5309	0.161446
ミリセチン	1.3196	0.16005
タンニン酸	1.3969	0.123811
クルクミン	2.4691	0.282381
アズールB	2.1701	0.044954
ベーシックブルー41	2.299	0.220559
コントロール	1	0.303872

- 10 平均値はコントロールを1とした場合の倍率である。

表1および図10に示すとおり、上記の化合物を加えた場合、A β の有意な溶出が観察された。

文献

- 15 1. DeMattos, R. B., K. R. Bales, et al. (2001).
 "Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease."
 Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8850-5.
2. Hartley, D. M., D. M. Walsh, et al. (1999).
- 20 "Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical

neurons.”

J Neurosci 19(20): 8876-84.

3. Lombardo, J. A., E. A. Stern, et al. (2003).

“Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of
5 plaque-induced neuritic alterations.”

J Neurosci 23(34): 10879-83.

4. Matsuoka, Y., M. Saito, et al. (2003).

“Novel therapeutic approach for the treatment of Alzheimer’s disease by
peripheral administration of agents with an affinity to beta-amyloid.”

10 J Neurosci 23(1): 29-33.

5. Okochi, M., H. Steiner, et al. (2002).

“Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of
Notch-1.”

Embo J 21(20): 5408-16.

15 6. Schenk, D., R. Barbour, et al. (1999).

“Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like
pathology in the PDAPP mouse.”

Nature 400(6740): 173-7.

20

産業上の利用可能性

以上の説明で明らかなように、本発明によれば、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定することが可能となり、それにより、現代社会に様々な波紋を投げかけているアルツハイマー病などの、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチド
25 またはタンパクの凝集に起因する疾患に関する治療・予防、あるいはそれらの研究に大いに役立つことが期待される。

本出願は、日本で出願された特願 2 0 0 4 - 1 0 7 7 4 6 を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

配列表フリーテキスト

5 配列番号 1 : A β (1 - 4 0)

配列番号 2 : A β (1 - 4 2)

請求の範囲

1. 被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維(fibril)または凝集物(aggregate)からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法。
 2. 薬剤候補が、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療に用いられるものである、請求項1記載の方法。
- 10
3. 疾患がアルツハイマー病(AD)、パーキンソン病(PD)、ハンチントン舞踏病、プリオン病、ダウン症、レビー小体型痴呆症、多系統萎縮症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ゲルストマン・ストロイスラー症候群、狂牛病、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症(SCA)、齒状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症(DRP LA)、
- 15
- 家族性筋萎縮性側索硬化症、FTDP-17、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、ピック病、familial British dementia およびニューロセルピン封入体を伴う家族性痴呆症からなる群より選ばれた疾患である、請求項1または2記載の方法。
- 20
4. 細線維または凝集物がインビトロで形成されたものである、請求項1ないし3いずれか記載の方法。
 5. 平衡状態が超音波照射下にもたらされたものである、請求項1ないし4いずれか記載の方法。
- 25
6. 超音波照射が実質的に熱発生を伴わないものである、請求項1ないし5いずれか記載の方法。

7. 超音波照射条件が、1 MHz、2 W/cm²、デューティ比20%、30秒照射に続き10秒休止の5回反復である、請求項1ないし6いずれか記載の方法。

5 8. 被験化合物の存在下、平衡状態にある可溶性β-アミロイド(Aβ)の溶媒中濃度を測定することにより、インビトロで凝集した細線維または凝集物からβ-アミロイド(Aβ)を除去することのできる薬剤候補を同定する方法。

9. 細線維または凝集物がAβ(1-40)からなる、請求項8記載の方法。

10

10. 細線維または凝集物がAβ(1-42)からなる、請求項8記載の方法。

11. 平衡状態が超音波照射下にもたらされたものである、請求項8ないし10いずれか記載の方法。

15

12. 超音波照射が実質的に熱発生を伴わないものである、請求項8ないし11いずれか記載の方法。

13. 超音波照射条件が、1 MHz、2 W/cm²、デューティ比20%、30
20 秒照射に続き10秒休止の5回反復である、請求項8ないし12いずれか記載の方法。

14. 患者に超音波照射することからなる、ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患の治療方法。

25

15. 疾患がアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン舞蹈病、プリオン病、ダウン症、レビー小体型痴呆症、多系統萎縮症、クロイツフェルト・ヤコ

ブ病、ゲルストマン・ストロイスラー症候群、狂牛病、球脊髄性筋萎縮症、脊髄小脳失調症（SCA）、歯状核赤核淡蒼球ルイ体萎縮症（DRPLA）、家族性筋萎縮性側索硬化症、FTDP-17、進行性核上性麻痺、皮質基底核変性症、ピック病、familial British dementia およびニューロセルピン封入体を伴う家族性

5 痴呆症からなる群より選ばれた疾患である、請求項14記載の方法。

16. 請求項1ないし13いずれか記載の方法により得られる化合物を有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出促進剤。

10

17. デヒドロポルフィリン第2鉄IX、アムホテリシンB、ミリセチン、タンニン酸、クルクミン、アズールBおよびベーシックブルー41からなる群より選ばれる少なくとも1つを有効成分として含有する、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための溶出促進

15 剤。

18. 請求項1ないし13いずれか記載の方法により得られる化合物を用いて、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを溶出する溶出方法。

20

19. 細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去するための、請求項1ないし13いずれか記載の方法により得られる化合物の使用。

25 20. ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの凝集に起因する疾患を治療するための装置であって、超音波を患部に照射し、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去する手

段を有することを特徴とする装置。

21. 被験化合物の存在下、細線維または凝集物から溶出した可溶性ペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクの溶媒中濃度を測定することにより、細線維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる薬剤候補を同定する方法。
- 5

図 1

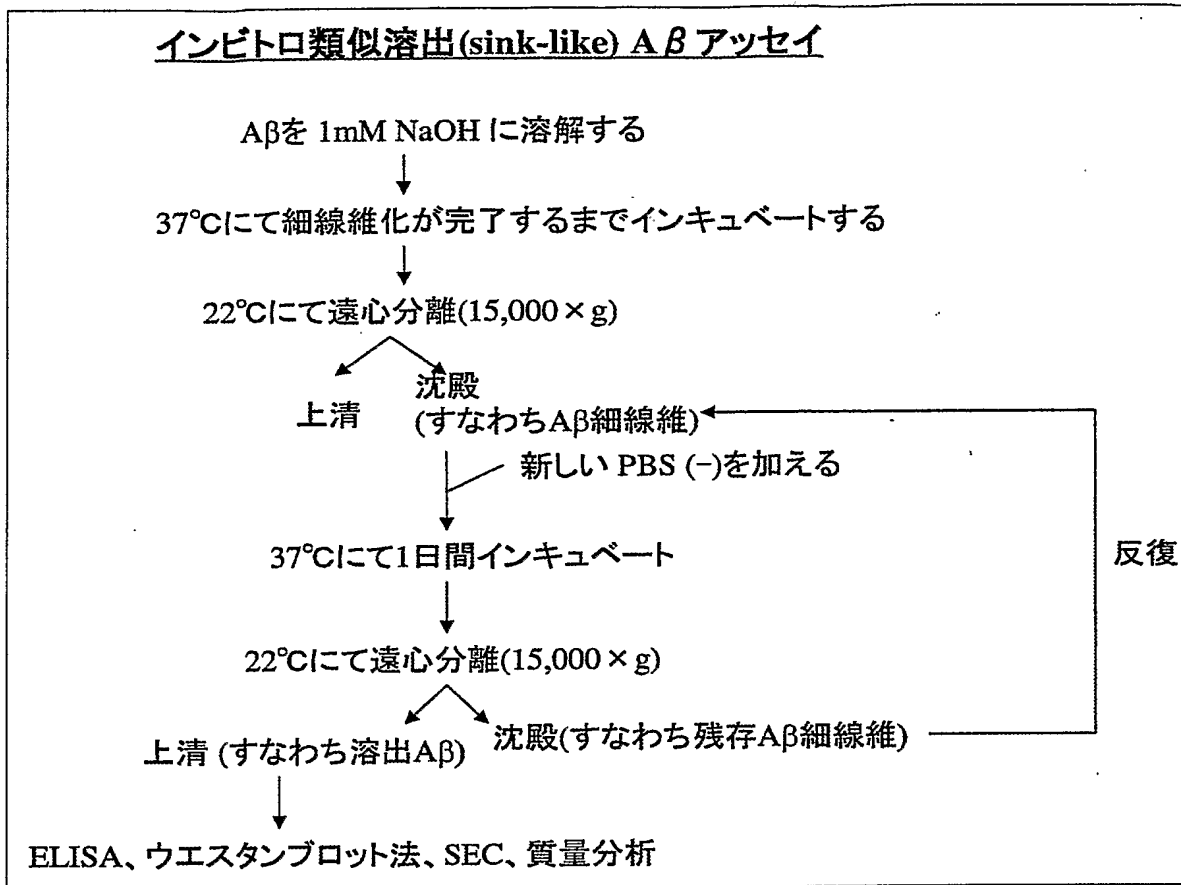


図 2

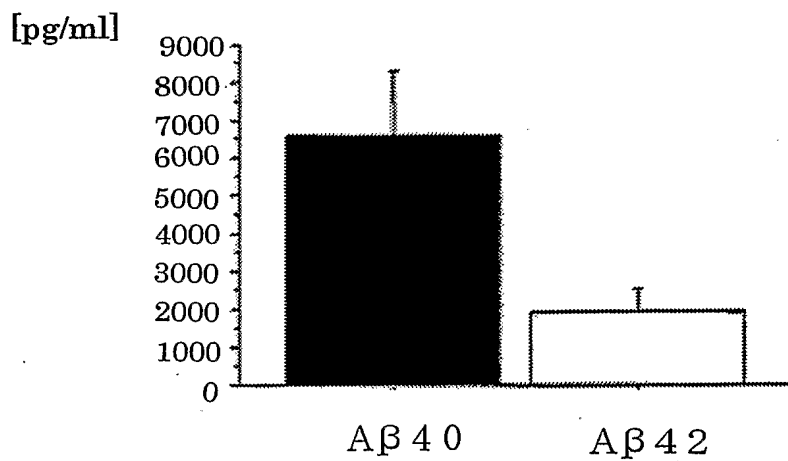


図 3

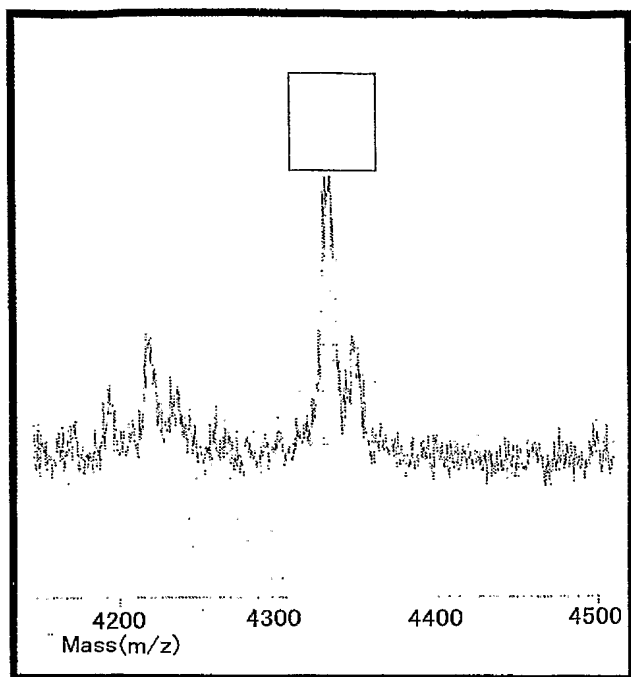
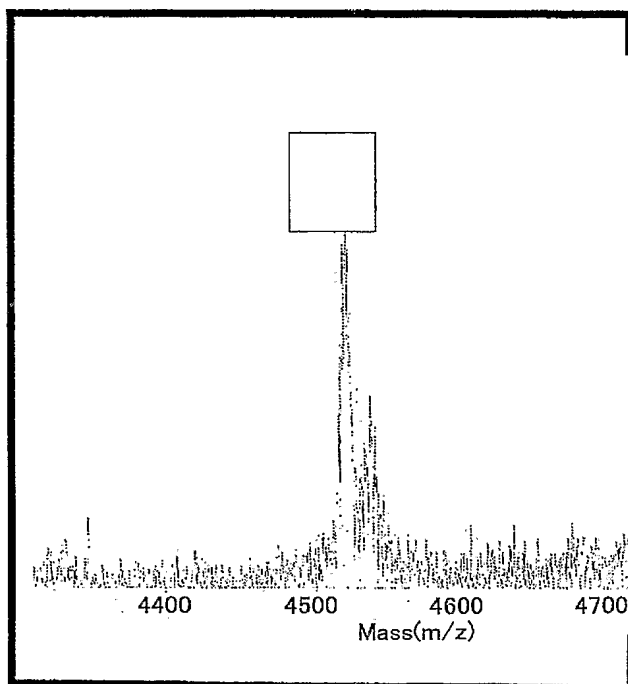
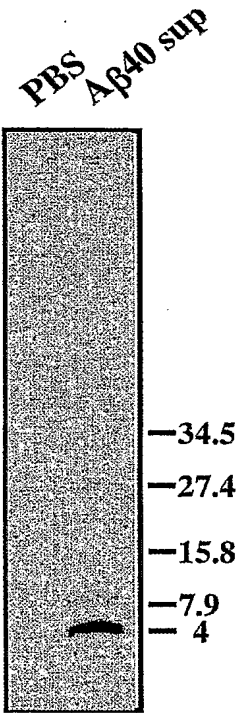
A β 40**A β 42**

図 4



WB : 6E10

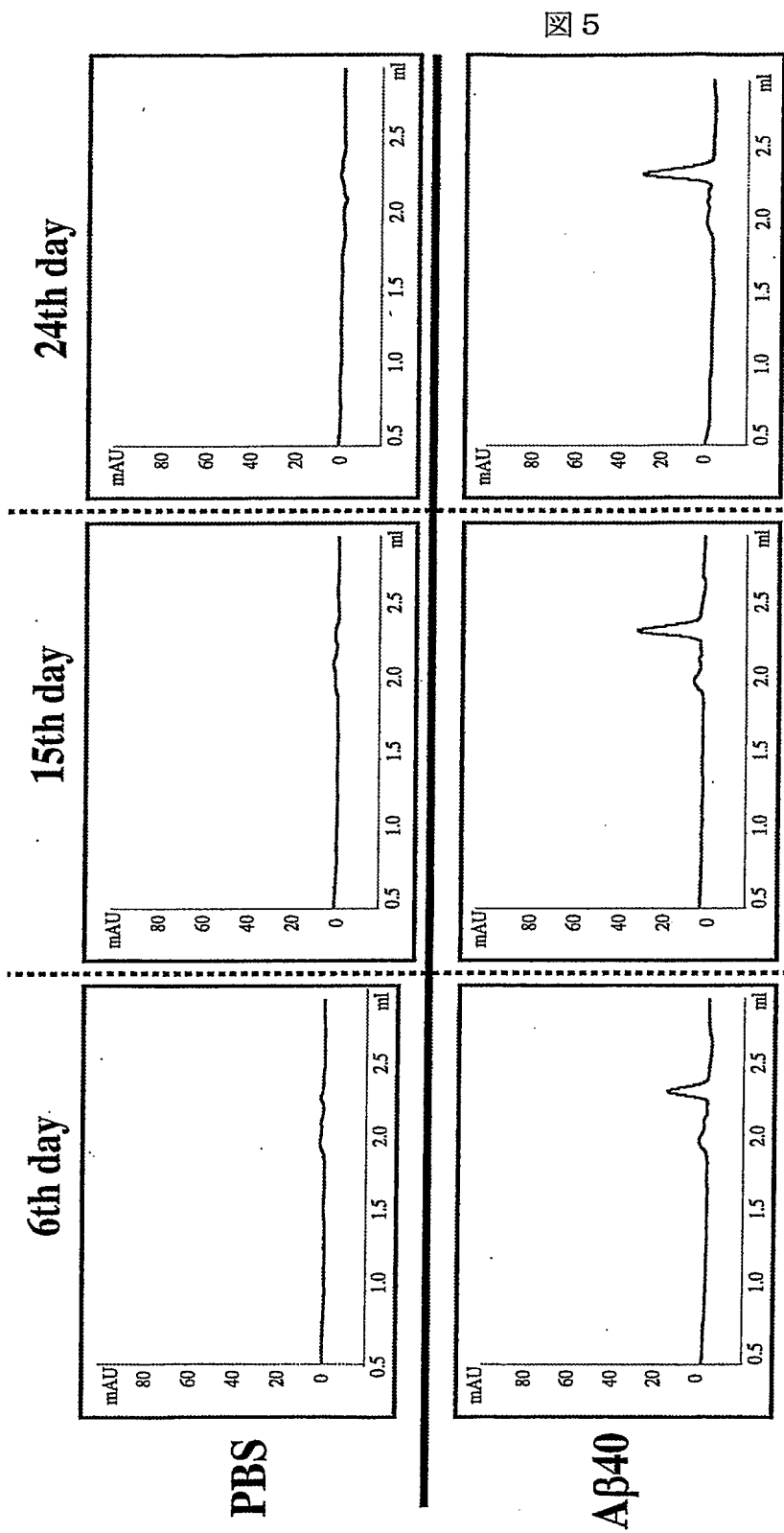


図 6

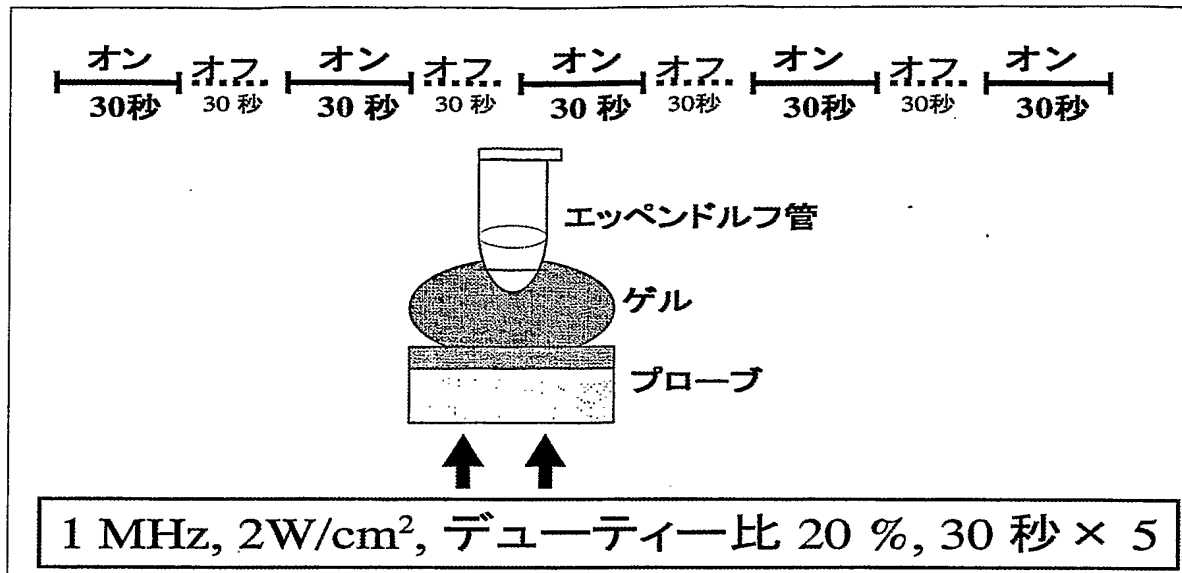


図 7

Aβ40

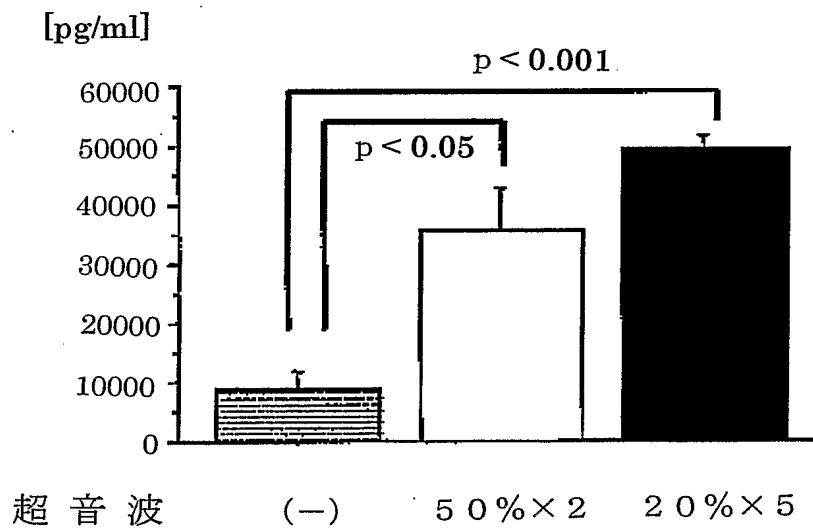


図 8

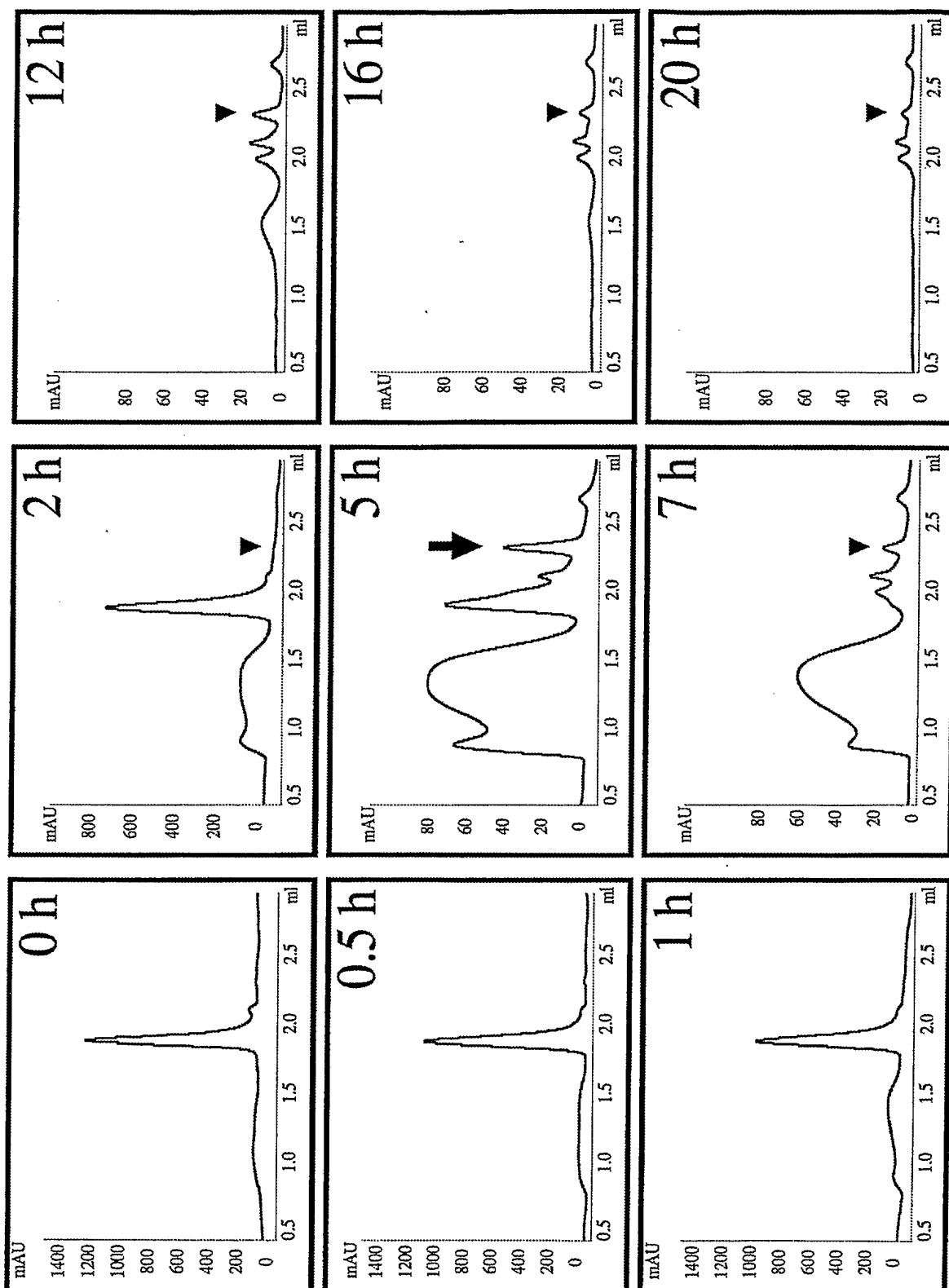


図 9

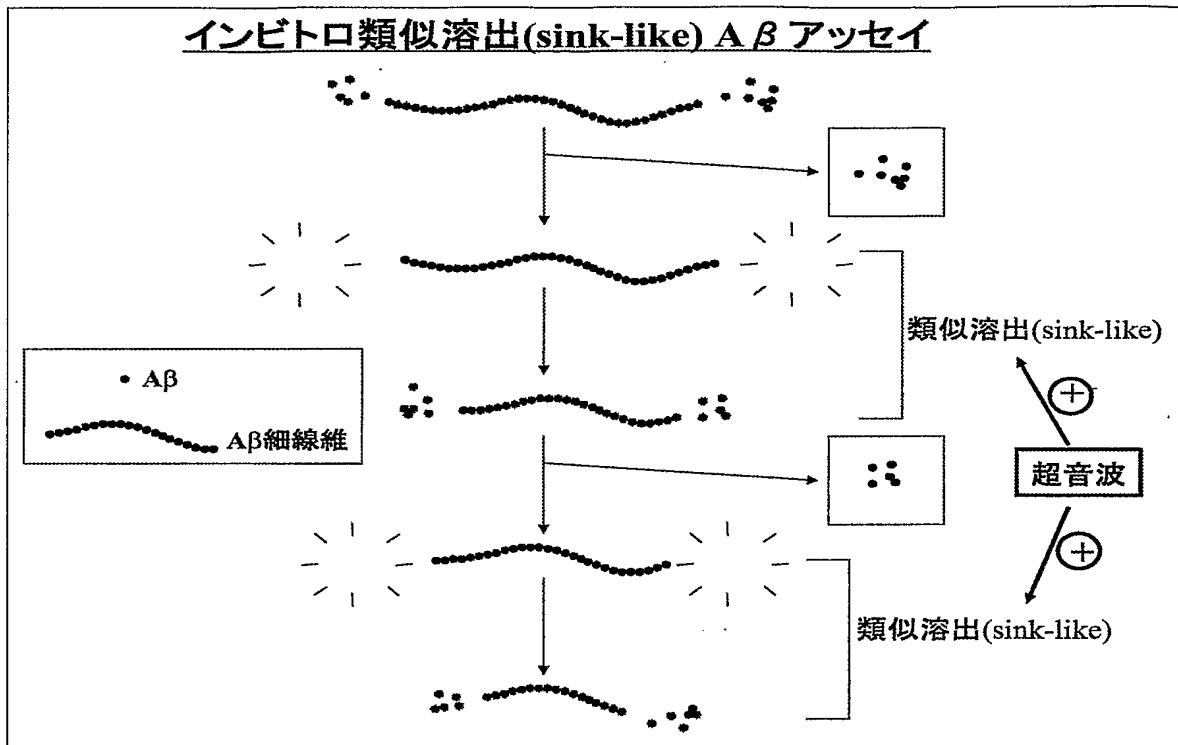
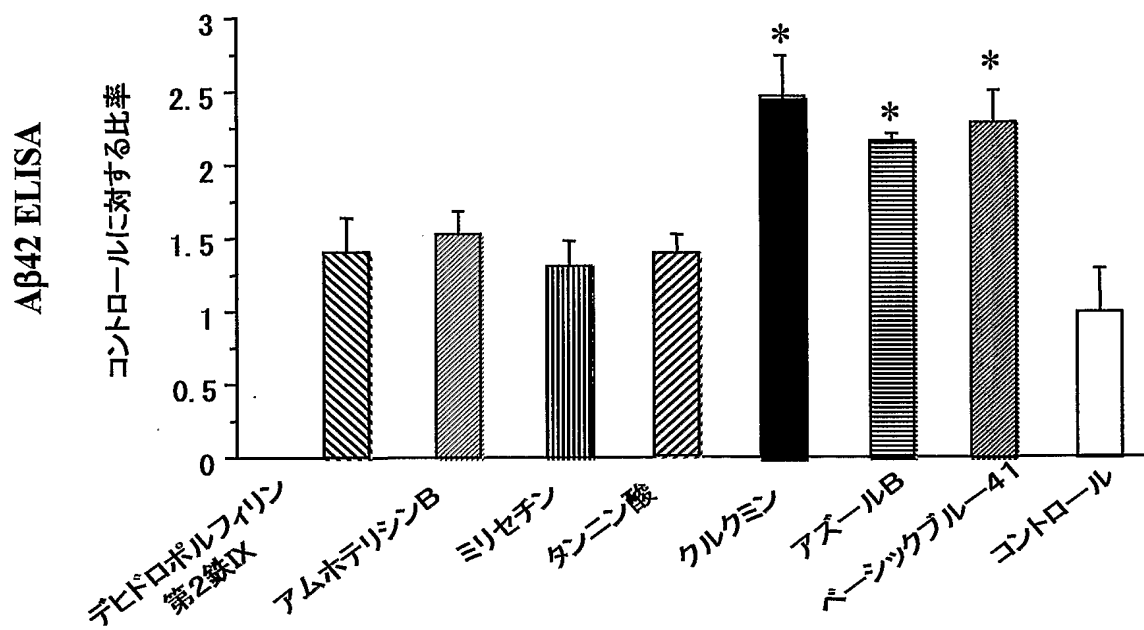


図 10

* $p < 0.05$

SEQUENCE LISTING

<110> AnGesMG, Inc.

<120> Assay method for identifying pharmaceutical candidate

<130> 09722

<150> JP 2004-107746

<151> 2004-03-31

<160> NUMBER OF SEQ ID NOS: 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 40

<212> Peptide

<213> Homo Sapiens

<223> OTHER INFORMATION: A β (1-40)

<400> SEQUENCE: 1

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV 40

<210> 2

<211> 42

<212> Peptide

<213> Homo Sapiens

<223> OTHER INFORMATION: A β (1-42)

<400> SEQUENCE: 2

DAEFRHDSGY EVHHQKLVFF AEDVGSNKGA IIGLMVGGVV IA 42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, G01N33/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ G01N33/50, G01N33/15, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2002-522747 A (The Regents of the University of California), 23 July, 2002 (23.07.02), Claims; Par. Nos. [0086] to [0101] & WO 1999/053295 A1 & EP 1071943 A	1, 4, 21/2, 3, 5-13, 16-19
Y	WO 2002/059150 A2 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ABERDEEN), 01 August, 2002 (01.08.02), Claims; page 16, lines 31 to 33 & EP 1348029 A	2, 3, 5-13, 16-19
A	Edited by Hiroshi TERADA, "Kagaku to Seibutsu, Jikken Line 48, Tanpakushitsu to Kakusan no Bunri Seisei", Hirokawa Shoten, 15 June, 2001 (15.06.01), page 20, Sonicator (Choonpashoriki)	6, 12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
19 May, 2005 (19.05.05)

Date of mailing of the international search report
07 June, 2005 (07.06.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006728

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kenjiro ONO et al., Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer's disease. J.Neurochem. 2003, Vol.87, pages 172 to 181, Abstract	17
X	Kenjiro ONO et al., Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. J.Neurosci.Res., 15 March, 2004 (15.03.04), Vol.75(6), pages 742 to 750, Abstract	17
X	JP 2003-199760 A (Hitachi Medical Corp.), 15 July, 2003 (15.07.03), Claims (Family: none)	20
A	JP 2002-536963 A (MYRIAD GENETICS, INC.), 05 November, 2002 (05.11.02), & WO 2000/037483 A1	1-4
A	JP 2003-325516 A (Hitachi Medical Corp.), 18 November, 2003 (18.11.03), (Family: none)	20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006728

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 14, 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 14 and 15 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006728

<Subject of search>

Claim 16 relates to an elution promoter comprising, as the active ingredient, a compound obtained by a desired identification method of "capable of eliminating a peptide, an oligopeptide, a polypeptide or a protein from a fibril or an aggregate", while claims 18 and 19 relate to an elution method using this compound or utilization of this compound. Although claim 16 involves any compounds having the above property in its scope, it is recognized that only small part of the claimed compounds are disclosed in the meaning within PCT Article 5 and thus it is not supported by the disclosure in the description in the meaning within PCT Article 6.

Concerning "a compound capable of eliminating a peptide, an oligopeptide, a polypeptide or a protein from a fibril or an aggregate", the scope of such compounds cannot be specified even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration. Thus, claims 16, 18 and 19 do not comply with the requirement of clearness in the meaning within PCT Article 6 too.

Such being the case, the search concerning claims 16, 18 and 19 was made on the compounds specifically cited in the description and specified in claim 17. Complete search was made on other claims.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ G01N 33/50, G01N 33/15, G01N 33/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl.⁷ G01N 33/50, G01N 33/15, G01N 33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X /Y	JP 2002-522747 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2002. 07. 23, 特許請求の範囲、【0086】-【0101】& WO 1999 /053295 A1 & EP 1071943 A	1、4、21 /2、3、5 -13、16 -19
Y	WO 2002/059150 A2 (ザ・ユニバーシティ・コー ト・オブ・ザ・ユニバーシティ・オブ・アバディーン) 2002. 08. 01, 特許請求の範囲、第16頁、第31行~33行 & EP 1348029 A	2、3、5- 13、16- 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
 19. 05. 2005

国際調査報告の発送日
 07. 6. 2005

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)	2 J	3 4 9 6
山村 祥子		
電話番号 03-3581-1101 内線 3252		

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	寺田 弘 編集、化学と生物 実験ライン48, タンパク質と核酸 の分離精製、廣川書店、2001. 06. 15、p. 20、ソニケ ーター (超音波処理機) の項	6、12
X	ONO Kenjiro et al. Potent anti-amyloidogenic and fibril-destabilizing effects of polyphenols in vitro: implications for the prevention and therapeutics of Alzheimer' s disease. J. Neurochem. 2003, Vol.87, p.172-181, Abstract	17
X	ONO Kenjiro et al. Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer' s beta-amyloid fibrils in vitro. J. Neurosci. Res. 2004.03.15. Vol.75(6), p.742-750, Abstract	17
X	J P 2003-199760 A (株式会社日立メディコ) 2003. 07. 15、特許請求の範囲、(ファミリーなし)	20
A	J P 2002-536963 A (ミリアド・ジェネティック ス・インコーポレイテッド) 2002. 11. 05、 & WO 2000/037483 A1	1-4
A	J P 2003-325516 A (株式会社日立メディコ) 2003. 11. 18、(ファミリーなし)	20

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1 4、1 5 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 1 4 及び 1 5 は人体の治療方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲16は、「細繊維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる」という所望の同定方法により得られた化合物を有効成分とする溶出促進剤であり、請求の範囲18及び19は、当該化合物を用いる溶出方法、あるいは当該化合物の使用である。そして請求の範囲16は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT第5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎず、PCT第6条の意味での明細書の開示による裏付けを欠くものと認められる。

また、「細繊維または凝集物からペプチド、オリゴペプチド、ポリペプチドまたはタンパクを除去することのできる化合物」は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲16、18、19は、PCT第6条における明確性の要件も欠いている。

よって、請求の範囲16、18、19の調査は、明細書に具体的に記載され、請求の範囲17に特定されている化合物について行った。また、その他の請求の範囲については、完全な調査を行った。